

UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Farmacia

*Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia
Farmaceutiche*

Tesi di Laurea:

**SVILUPPO CHIMICO E ANALITICO DEI COMPONENTI
NUTRACEUTICI DELL'OLIO D'OLIVA
A STRUTTURA FENOLICA E POLIFENOLICA**

Relatore: *Prof. Marco Macchia*

Candidato: *Mattia Bassi*

Prof.ssa Clementina Manera

ANNO ACCADEMICO 2013–2014

INDICE

1. Introduzione -.....	3
1.1 Descrizione-.....	4
1.2 Com'è fatta un'oliva?-.....	9
1.3 Tipologie di olio d'oliva-.....	10
1.4 Composizione chimica dell'olio d'oliva-.....	11
1.5 L' analisi sensoriale (Panel Test)-.....	15
1.6 Composizione fenolica e polifenolica dell'olio di oliva-....	16
1.7 Fattori che influenzano la concentrazione fenolica-.....	18
1.8 Proprietà salutistiche-.....	19
1.8.1 L'oleacina come anti-infiammatorio naturale-.....	19
1.8.2 Oleaceina nella prevenzione per le malattie cardiovascolari-	20
2. Introduzione alla parte sperimentale-.....	22
3. Parte sperimentale-.....	37
3.1 Sintesi-.....	38
3.2 Analisi ¹ HNMR-.....	48
4. Bibliografia-.....	50

1. INTRODUZIONE

1.1 DESCRIZIONE



Figura 1: La pianta *Olea europaea* L.

L'olio di oliva si presenta come un liquido viscoso giallo-verde di sapore gradevole ottenuto dalla frantumazione e spremitura del frutto maturo della pianta *Olea europaea* L. (**Figura 1**).

Questa pianta ha origini antiche: è originaria del Medio Oriente, si è diffusa a partire dal 5000 a.C. fino al 1400 a.C. a Creta, in Siria, in Palestina e a Israele, per arrivare poi in tutti i paesi del Mediterraneo.

Le proprietà terapeutiche e salutistiche dell'olio d'oliva sono conosciute da millenni tant'è che già Ippocrate consigliava il succo di olive fresche per curare le malattie mentali e impacchi per guarire le ulcere.

Nel Medioevo e durante il Rinascimento l'olio d'oliva è stato usato per curare le infezioni ginecologiche ed era ritenuto utile nella cura delle cardiopatie, della febbre, dell'ipertensione, come antidiabetico e diuretico.

Nell'Ottocento l'olio d'oliva è stato adoperato per curare l'otite, per cospargere le gengive colpite da piorrea, per le nevriti, per le distorsioni e come blando purgante.

Fino a pochi anni fa, prima della disponibilità della vitamina D, l'olio d'oliva veniva impiegato per massaggiare i bambini rachitici.

Attualmente esiste una ampia letteratura scientifica sulle proprietà terapeutiche dell'olio d'oliva, la quale mette in evidenza molteplici meccanismi d'azione a livello tissutale, cellulare e molecolare tant'è che è opinione comune che i benefici effetti della dieta Mediterranea siano dovuti in larga misura al connesso impiego di questo olio.¹

Diversi studi epidemiologici indicano che il consumo regolare di olio d'oliva nella dieta Mediterranea (**Figura 2**), è inversamente correlato a diversi tipi di tumori come il tumore al seno, al colon, endometrio e ovaio. Inoltre, è stato dimostrato che l'olio contrasta l'invecchiamento, inibisce la secrezione acida dello stomaco, favorisce la secrezione pancreatica, il drenaggio della bile e riduce il diabete.^{2,3}

La dieta mediterranea è altresì associata a bassi tassi di malattie neurodegenerative come ictus e Alzheimer.⁴

Dunque è chiaro che, grazie alla presenza dell'olio di oliva, la dieta mediterranea associata ad un corretto stile di vita ne aumenta le prospettive della stessa.

Un consumo giornaliero di 50 g di olio extravergine di oliva è consigliato per avere una diminuzione della mortalità cardiovascolare del 47% rispetto alla parte della popolazione che non consuma giornalmente olio extravergine di oliva.^{2,5}



Figura 2: Immagine piramide alimentare della dieta mediterranea

La prima indagine sulle proprietà nutraceutiche dell'olio d'oliva fu condotta dal biologo e fisiologo statunitense Ancel Keys.

Si tratta del "Seven Countries Study",⁶ uno studio comparativo dei regimi alimentari in sette nazioni (Stati Uniti, Italia, Olanda, Grecia, Finlandia, Giappone ed Ex Jugoslavia).

Questo studio mise in luce che gli abitanti dell'isola di Creta possedevano il più basso indice di mortalità per malattie cardiovascolari e ciò venne messo in relazione con l'utilizzo dell'olio d'oliva nella cottura e nel condimento dei cibi a discapito di altri oli di origine vegetale e del burro.

Da allora in poi i ricercatori di tutto il mondo hanno condotto numerosi studi per ampliare le loro conoscenze e per comprendere le eccezionali proprietà nutraceutiche dell'olio d'oliva.

Diversi studi indicano che le attività terapeutiche dell'olio di oliva sembrano essere dovute alla componente fenolica (oleocantale, oleaceina, oleuropeina e idrossitirosolo).

Infatti tali studi sostengono che questi composti sono in grado di "ripulire" l'organismo dai radicali perossidici, dal radicale superossido, dall'acido ipocloroso e dallo ione perossinitrato.

Inoltre i componenti fenolici sono capaci di far diminuire le malattie croniche degenerative, cardiovascolari, il diabete e ostacolano il processo di cancerogenesi attraverso azioni anti-ossidanti e anti-infiammatorie (mediata dalle COX 1 e COX 2) ma anche per interferenza su specifici meccanismi cellulari.⁷⁻⁹

Recentemente l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), secondo il Regolamento CE 1924/2006, ha approvato un "health claim" con il quale si riconoscono specifici effetti salutistici dell'olio d'oliva riferiti a composti fenolici e polifenolici quali tirosolo, idrossitirosolo e oleuropeina: "i polifenoli dell'olio d'oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo; questa indicazione può essere impiegata solo per l'olio d'oliva che contiene almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati (ad esempio complesso oleuropeina e tirosolo) per 20 g di olio d'oliva" (dose giornaliera raccomandata).

E' noto infatti che l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL, low-density lipoproteins, note anche come "colesterolo buono") è la principale causa dello sviluppo di malattie cronico-degenerative come l'aterosclerosi.

E' stato dimostrato che i polifenoli si legano alle LDL sottraendole così all'ossidazione da parte dei radicali liberi.

La famiglia dei composti fenolici e polifenolici caratteristici dell'olio d'oliva comprende composti semplici come il tirosolo e l'idrossitirosolo e composti più complessi come i derivati secoiridoidi.

In particolare l'oleaceina e l'oleuropeina aglicone sono derivati dell'idrossitirosolo mentre l'oleocantale e ligstroside aglicone sono derivati del tirosolo (**Figura 3**).

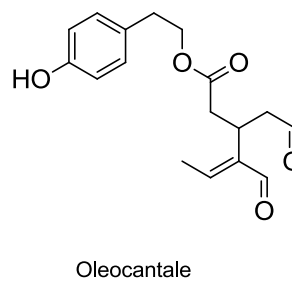
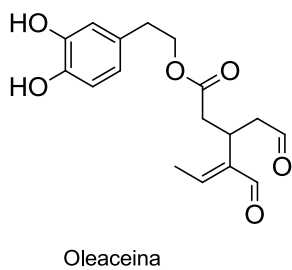
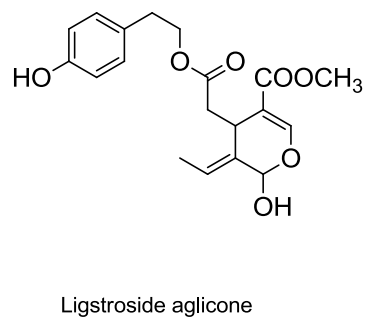
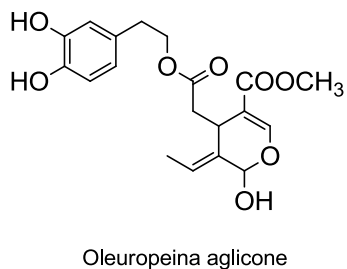
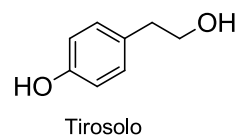
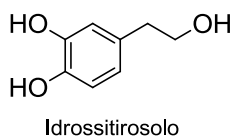


Figura 3: Principali composti fenolici e polifenolici dell'olio di oliva

1.2 COM'E' FATTA UN'OLIVA?

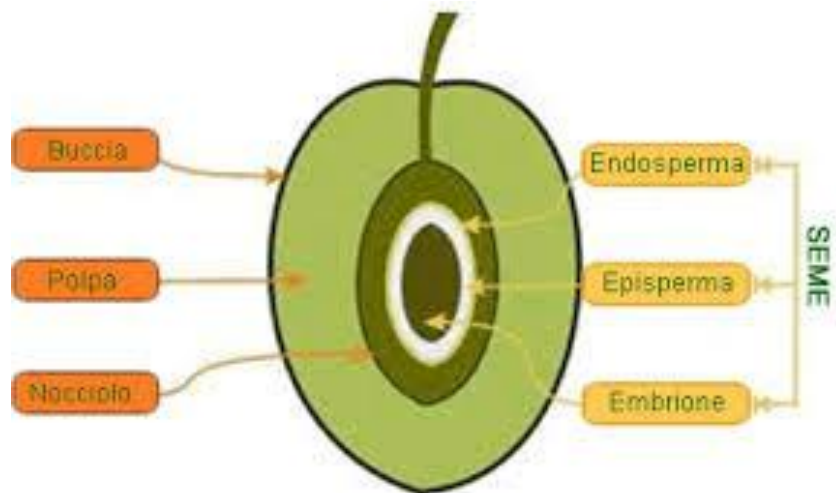


Figura 4: Immagine di un'oliva matura

Il peso dell'oliva a maturazione avvenuta, varia fra 0,5 e 20 gr.

Il colore subisce una trasformazione detta invariatura.

Inizialmente l'oliva è di colore verde ma nel corso della maturazione vira al giallino per poi assumere un caratteristico colore violaceo, particolarmente intenso a maturazione compiuta.

Il processo di maturazione avviene in un arco di tempo che varia a seconda delle cultivar e delle condizioni climatiche.

Dal punto di vista anatomico l'oliva (**Figura 4**) è costituita da:

- Epicarpo o buccia
- Mesocarpo o polpa
- Endocarpo o nocciolo (all'interno del nocciolo è contenuto il seme)

I componenti più importanti in termini di quantità presenti nel frutto fresco sono:

- L'acqua (40-70%)
- Sostanze grasse (6-25%)

Importanti elementi presenti nel frutto sono:

- I composti idrosolubili (zuccheri semplici, sostanze fenoliche e azotate, acidi organici)
- Le sostanze insolubili in acqua di natura colloidale (cellulose, pectine e proteine strutturali ed enzimatiche)

1.3 TIPOLOGIE DI OLIO D'OLIVA

In base a diverse tecniche di ottenimento dell'olio (**Figura 5**) esistono diverse tipologie di olio come olio di oliva di sansa, olio di oliva lampante, olio biologico, olio dop, olio affiorato e olio vergine.

Quest'ultimo, definito dalla CEE con il regolamento n.356/92, si ottiene dalla sola spremitura meccanica delle olive non trattate né termicamente né chimicamente ed è la tipologia di olio di maggior rilevanza dal punto di vista nutraceutico poiché viene prodotto in modo tale da mantenere immutato il loro contenuto lipidico e soprattutto il contenuto di componenti minori in particolare di antiossidanti.

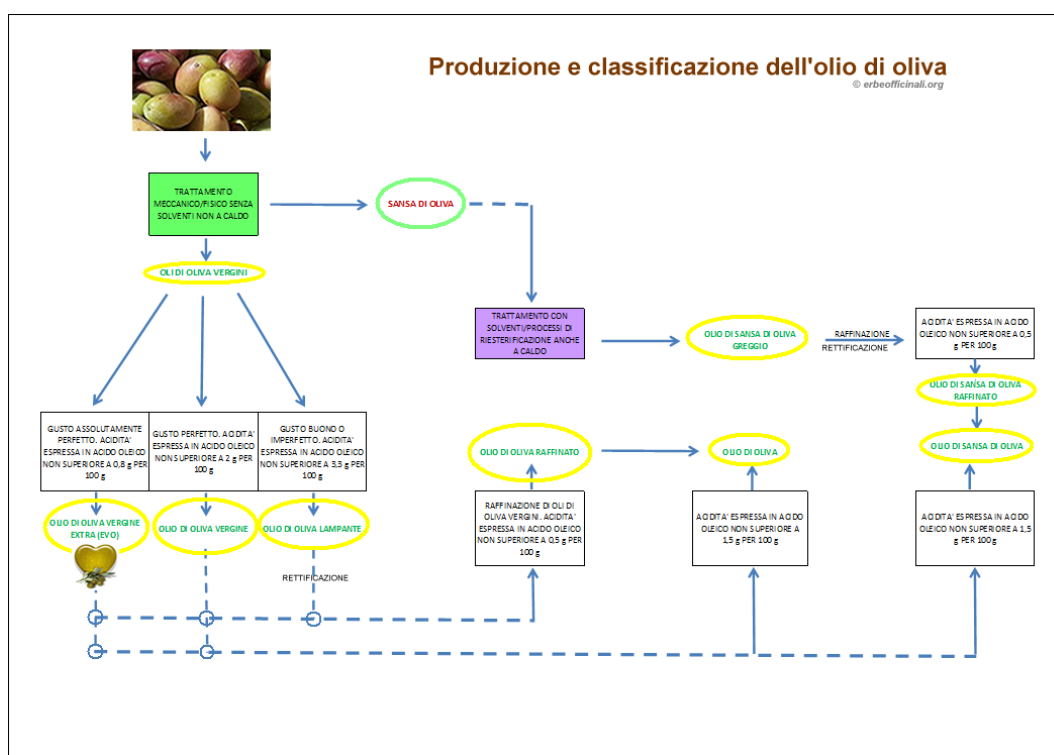


Figura 5: Schema di produzione olio extravergine di oliva

L'olio di oliva vergine a seconda del valore di acidità libera espressa come percentuale di acido oleico viene distinto in olio di oliva vergine se l'acidità libera è al massimo di 2 gr per 100 gr e olio extravergine di oliva (EVOO) se l'acidità libera è al massimo di 0,8 gr per 100 gr.

1.4 COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'OLIO

L'olio d'oliva. è formato da:

- Una frazione saponificabile o apolare che è rappresentata da una miscela di trigliceridi, dell'ordine del 98-99% (**Figura 6**).

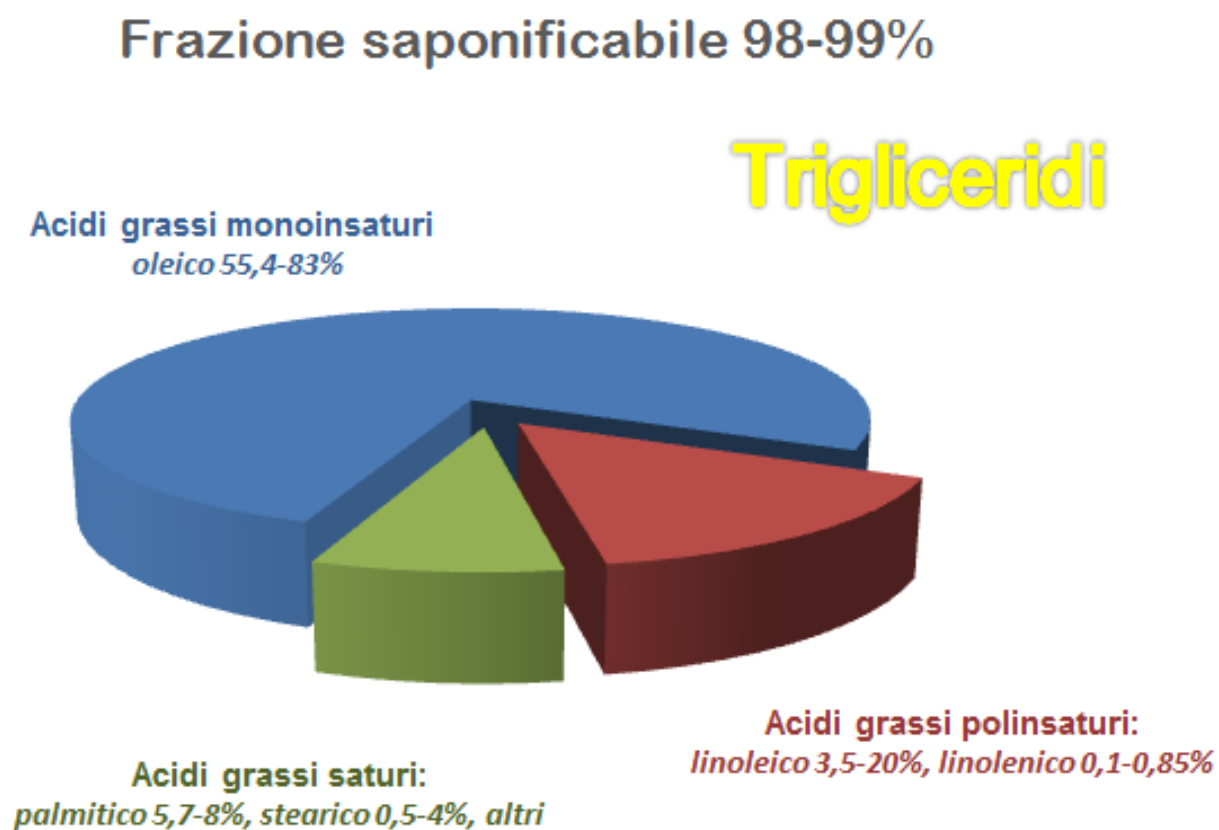


Figura 6: Frazione saponificabile dell'olio

- Una frazione insaponificabile o polare, dell'ordine del 1-2% che comprende gli steroli, i polifenoli, le clorofille, vitamine liposolubili come il tocoferolo e altri componenti minori quali gli alcoli e i carotenoidi (**Figura 7**).

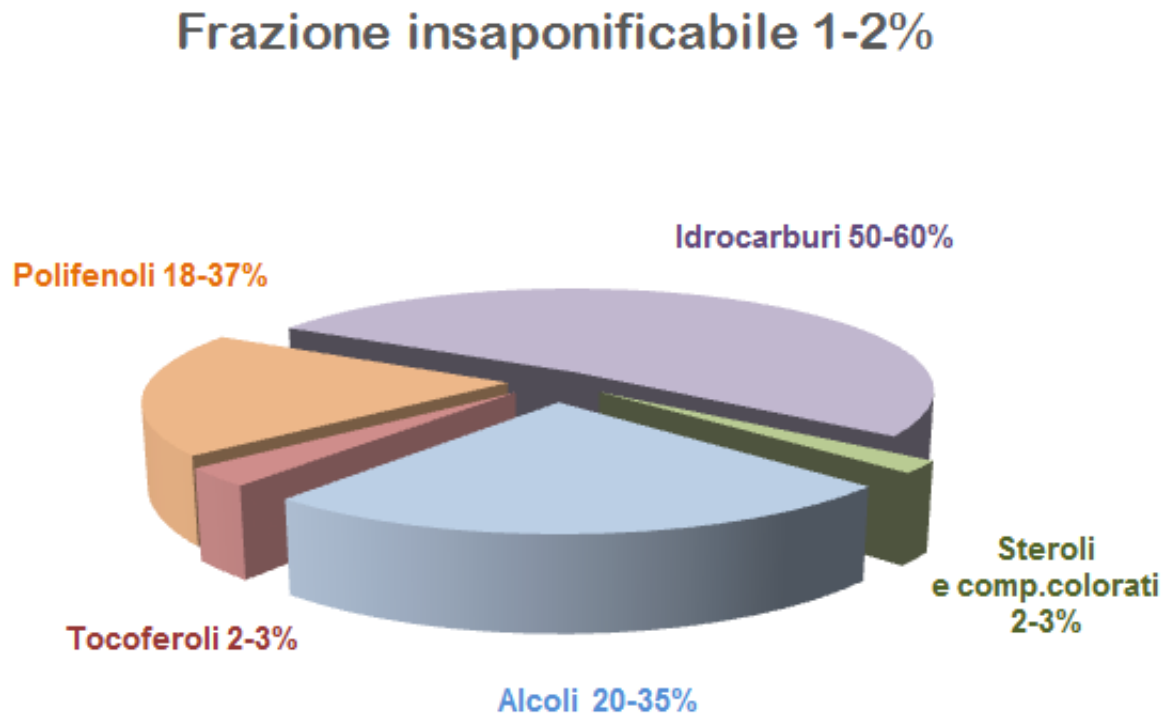


Figura 7: Frazione insaponificabile dell'olio

La frazione saponificabile dell'olio è costituita dagli esteri della glicerina con acidi grassi a lunga catena sia saturi che mono e poli insaturi. Gli acidi grassi più importanti che entrano a far parte delle molecole dei trigliceridi sono:

- l'acido oleico, monoinsaturo, che è presente per il 73%
- l'acido linoleico, diinsaturo, che rappresenta il 0,7% circa
- l'acido palmitico, saturo che rappresenta il 7-15%
- l'acido stearico, anch'esso saturo, presente per l'1,5-3,5%

L'alto contenuto dell'acido oleico (**Figura 8**) presente nell'olio d'oliva è la principale caratteristica che lo differenzia dagli altri grassi di origine vegetale. Inoltre sembra essere rilevante per contrastare l'insorgenza dell'ischemia cardiovascolare, infatti studi recenti hanno evidenziato che un basso livello di acido oleico nelle piastrine causa questa patologia.

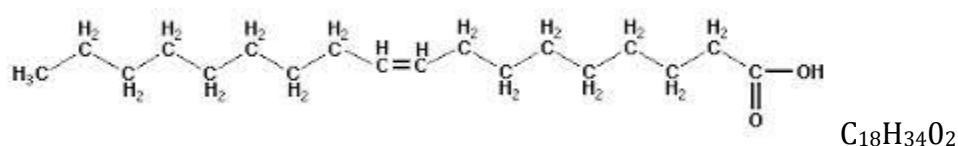


Figura 8: Acido oleico

Per quanto riguarda gli acidi poli-insaturi (PUFA) ci sono l'acido linolenico (0,1-0,6%) e linoleico (3,5-20,0%), che appartengono rispettivamente alla categoria degli omega-3 e degli omega-6, sono indicati come acidi grassi essenziali (AGE) per l'impossibilità di essere sintetizzati dal nostro organismo.

L'acido linoleico e l'acido linolenico influenzano l'aggregazione piastrinica, la vasodilatazione e costrizione delle arterie coronariche, la pressione del sangue e sono coinvolti nella produzione di energia, formazione di membrane cellulari, sintesi dell'emoglobina e nel corretto equilibrio ormonale.

Gli acidi grassi poli-insaturi, per la presenza di doppi legami, conferiscono all'olio una maggiore fluidità, ne abbassano il punto di fusione, ma lo rendono più reattivo, meno stabile chimicamente perché più facilmente attaccabile dall'ossigeno.

La frazione insaponificabile comprende circa 220 sostanze alcune delle quali dotate di valore terapeutico e nutrizionale (alcoli e steroli); altre rappresentano la parte principale della nota aromatica dell'olio (polifenoli), e altre ancora (tocoferoli e polifenoli) sono efficaci antiossidanti naturali in grado di conferire al prodotto resistenza all'invecchiamento e all'irrancidimento.

Le principali classi di sostanze presenti nella frazione insaponificabile sono:

- idrocarburi (50-60%) prevalentemente lo squalene
- alcoli superiori alifatici e triterpenici (20-35%), tra gli alcoli alifatici superiori spicca il cicloartenolo la cui azione favorisce l'eliminazione di colesterolo.

- Steroli (2-3%) la cui composizione percentuale è caratteristica della specie botanica e non è influenzata dalle variazioni genetiche quindi un'analisi del campione permette di riconoscere la presenza di frode nell'olio (es viene tagliato con olio di colza). In particolare nell'olio è presente il β -sitosterolo al quale vengono attribuite importanti azioni terapeutiche come chemio protezione attraverso un aumento dell'apoptosi, protezione dalle malattie cardiovascolari mediante un ridotto assorbimento del colesterolo nell'intestino e infine un'azione stimolante sul sistema immunitario.
- Polifenoli (18-37%), hanno una struttura base benzenica e vari gruppi tra cui quello alcolico -OH e acido -COOH- esplicano un'azione antiossidante e protettiva per l'olio conferendogli stabilità, qualità nutrizionali, salutistiche e peculiarità sensoriali.
- Vitamine liposolubili: tocoferoli (2-3%), sono presenti oltre alla vitamina E (alfa-tocoferolo, 300mg/l) la provitamina A (β carotene), la vitamina F e la vitamina D. Le vitamine inibiscono il processo di irrancidimento dell'olio.
- Pigmenti colorati: carotenoidi (fino a 100mg/100g di olio) e clorofilla (a,b) la quale varia in relazione alle cultivar e allo stato di maturazione dei frutti ed è responsabile del colore verde dell'olio.

Queste sostanze in presenza di luce agiscono da pro-ossidanti, ovvero facilitano la degradazione dell'olio: per questa ragione l'olio va conservato al buio per non incorrere nel rischio di irrancidimento.

La clorofilla svolge un ruolo di eccitamento sul metabolismo, di stimolo della crescita cellulare, sulla produzione del sangue e di accelerazione dei processi di cicatrizzazione.

Tra i carotenoidi il più rappresentativo è il beta-carotene che impedisce all'ossigeno di generare il passaggio di iniziazione nella produzione di radicali.

- Prodotti del metabolismo secondario (aldeidi, chetoni, esteri, ecc).

1.5 L'ANALISI SENSORIALE (PANEL TEST)

L'Analisi sensoriale valuta le caratteristiche di un prodotto alimentare che interagiscono con gli organi di senso e per ognuna di queste individua particolari descrittori che la identificano e la quantificano. L'olio di oliva viene sottoposto a valutazione basata sul sistema del Panel Test: con questo termine si indicano le votazioni date da un gruppo di 8-12 assaggiatori appositamente preparati con corsi professionali (metodo COI) che indipendentemente gli uni dagli altri, esprimono il loro giudizio sulle caratteristiche organolettiche dell'olio.

Il regolamento CEE n.2568/91 stabiliva che un olio sottoposto all'assaggio venisse assegnato a una determinata categoria merceologica in base al punteggio ottenuto (Figura 9).¹⁰

CATEGORIA	DESTINAZIONE AL CONSUMO	ACIDITÀ %	PEROSSIDI (mEqO2/Kg)	K232nm	K270nm	PANEL TEST (N)
Olio di oliva extravergine	al consumo	max 1.0	max 20	max 2.5	max 0.2	min 6.5
Olio di oliva vergine	al consumo	max 2.0	max 20	max 2.6	max 0.25	min 5.5
Olio di oliva vergine corrente	all'ingrosso	max 3.3	max 20	max 2.6	max 0.25	min 3.5
Olio di oliva vergine lampante	all'ingrosso	min 3.3	min 20	max 3.7	max 0.25	min 3.5
Olio di oliva raffinato	all'ingrosso	max 0.5	min 5	max 3.4	max 1.2	--
Olio di oliva	al consumo	max 1.5	max 15	max 3.3	max 1.0	--
Olio di sansa di oliva greggio	all'ingrosso	min 2.0	--	--	--	--
Olio di sansa di oliva raffinato	all'ingrosso	max 0.5	max 5	max 5.5	max 2.5	--
Olio di sansa di oliva	al consumo	max 1.5	max 15	max 5.3	max 2.0	--

Figura 9: Tabella classificazione dell'olio d'oliva

1.6 COMPOSIZIONE FENOLICA E POLIFENOLICA DELL'OLIO DI OLIVA

I composti fenolici e polifenolici dell'olio d'oliva possono essere classificati in fenil-acidi, secoiridoidi, fenil-alcoli, flavonoidi e lignani. I fenil-acidi presenti nell'olio d'oliva derivano dall'acido benzoico e cinnamico.

A questi composti appartengono l'acido caffeico, vanillico, siringico, para-cumarico, orto-cumarico, protocatechico, sinapico e para-idrossibenzoico e sono presenti in minime quantità nell'olio di oliva.

I composti classificati come secoiridoidi sono caratterizzati da un punto di vista chimico dalla presenza dell'acido elenolico nella loro struttura e possono essere sia composti glucosidici, sia i corrispondenti agliconi privi dunque della porzione zuccherina. Sono dei composti esclusivi delle piante appartenenti alla famiglia delle oleacee, che include *Olea europea L.*

I maggiori esponenti glucosidici di questa classe sono l'oleuropeina, la demetiloleuropeina e il ligstroside (**Figura 10**).

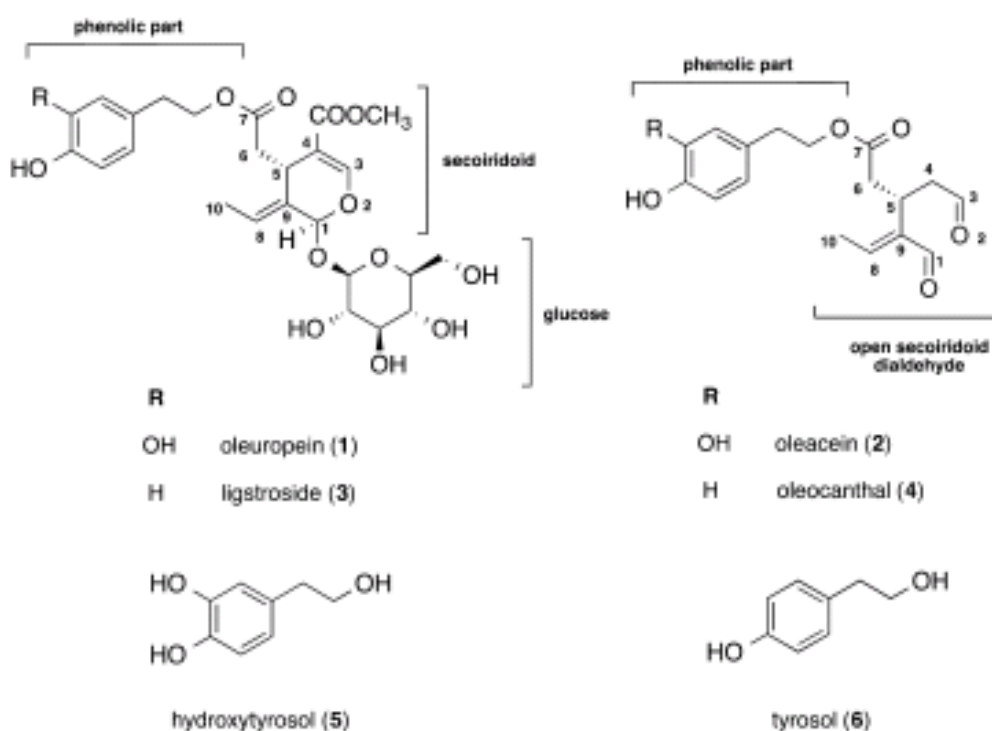


Figura10 Principali derivati secoiridoidi glucosidici dell'olio d'oliva (da H. Obied et al.,2008)

L'oleaceina e l'oleocantale fanno parte della componente fenolica dell'olio e derivano rispettivamente dall'idrossitirosolo e dal tirosolo che appartengono alla classe delle fenil-alcoli e sono molecole importanti dal punto di vista nutraceutico.

Le concentrazioni dei fenil alcoli sono generalmente basse nell'olio appena franto e tendono ad aumentare durante lo stoccaggio grazie all'idrolisi operata dalla beta-glucosidasi (contenuta nel mesocarpo del frutto) di derivati esterificati (secoiridoidi) che li contengono nella loro struttura; ovvero oleuropeina e ligstroside a dare i corrispondenti derivati agliconici oleaceina, oleocantale, oleuropeina aglicone e ligstroside aglicone.¹¹

1.7 FATTORI CHE INFLUENZANO LA CONCENTRAZIONE FENOLICA.

Ben noto è che diversi oli hanno diverse caratteristiche e dunque diverse concentrazioni di composti fenolici, dipendenti da differenti fattori agronomici e di lavorazione.^{12,13}

Tra i fattori agronomici rientrano l'ambiente di coltivazione, la cultivar, la difesa da parassiti, le tecniche di coltivazione e il periodo di raccolta.

La cultivar rappresenta sicuramente la variabile più importante: ogni varietà presenta un suo profilo sensoriale dato dalle sostanze aromatiche tipiche della varietà stessa, un diverso quantitativo di fenoli ed una specifica composizione sterolica.^{14,15}

Per quanto riguarda l'ambiente di coltivazione si è visto che in Italia l'olio di oliva extravergine prodotto contiene una concentrazione di composti fenolici (191.8 ± 2.7 mg/kg) maggiore rispetto agli Usa (22.6 ± 0.6 mg/kg).^{15,16}

Tecniche di coltivazione diverse influenzano la concentrazione dei composti fenolici, ad esempio: ulivi molto irrigati con acqua (23.1 ± 1.3 mg/kg) portano ad una diminuzione della concentrazione dei composti fenolici rispetto a ulivi meno irrigati (50.0 ± 6.5 mg/kg).¹²

Il periodo di raccolta ottimale delle olive coincide con la "maturazione ottimale" ovvero con il massimo grado di inolizione (accumulo di olio) nella drupa. L'oliva si presenta di colore verde intenso con contenuto basso di perossidi, bassa acidità ed elevato contenuto di fenoli. Superato questo periodo (2 mesi) si giunge alla "maturazione fisiologica" la quale porta ad un olio dolce, scarsamente conservabile e povero di composti fenolici.^{12,17}

Ultimo ma non meno importante fattore agronomico è la difesa da parassiti: tutti i parassiti, sia di origine animale che vegetale agiscono negativamente sulla qualità dell'olio con particolare riferimento all'acidità, al numero di perossidi, alle cere e al colesterolo.

Per quanto riguarda il tipo di lavorazione l'olio extravergine di oliva prodotto nella lavorazione tradizionale (tutta l'oliva è schiacciata) presenta una minore concentrazione di composti fenolici rispetto al caso in cui il nocciolo dell'oliva venga rimosso prima della frantumazione. Infatti l'olio prodotto nella lavorazione tradizionale contiene alte quantità di perossidi che idrolizzano i composti fenolici.^{18,19}

Importantissima è anche la conservazione dell'olio la quale non deve superare i 10 mesi altrimenti diminuisce la componente fenolica.¹²

1.8 PROPIETA' SALUTISTICHE

Tra i componenti fenolici dell'olio d'oliva è presente l'Oleaceina (**Figura 11**), su cui ho focalizzato il mio lavoro di tesi.

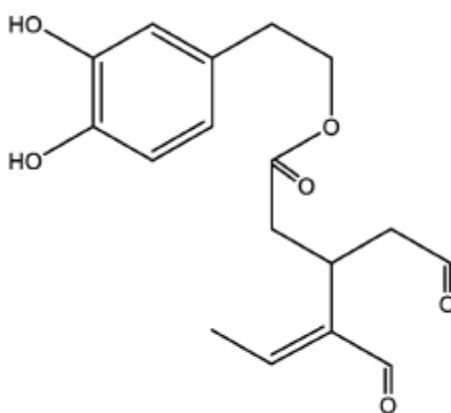


Figura 11: Struttura dell'Oleaceina

1.8.1 L'Oleaceina come anti-infiammatorio naturale

L'Oleaceina inibisce l'azione pro-infiammatoria dell'Enzima 5 lipossigenasi (5-LO), con valori di EC_{50} tra 15-500 nM, inibendo così la sintesi di leucotrieni.

L'enzima 5-LO è un enzima ubiquitario attivato in seguito a traumi e a stress esterni, appartenente alla classe delle ossido reduttasi che tramite l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi forma idroperossidi coniugati.

Si tratta di una proteina globulare solubile in acqua contenente uno ione ferroso come cofattore nel sito attivo.

L'Oleaceina, come altri composti fenolici dell'olio di oliva (**Figura 12**) avendo gruppi ossidrilici fenolici, chela il ferro presente nel sito attivo dell'enzima e impedisce l'ossidazione dello ione ferroso a ione ferrico rendendo l'enzima inattivo con IC_{50}

confrontabile con quella dello Zileuton un farmaco inibitore dell' E 5-LO in commercio.²⁰⁻²²

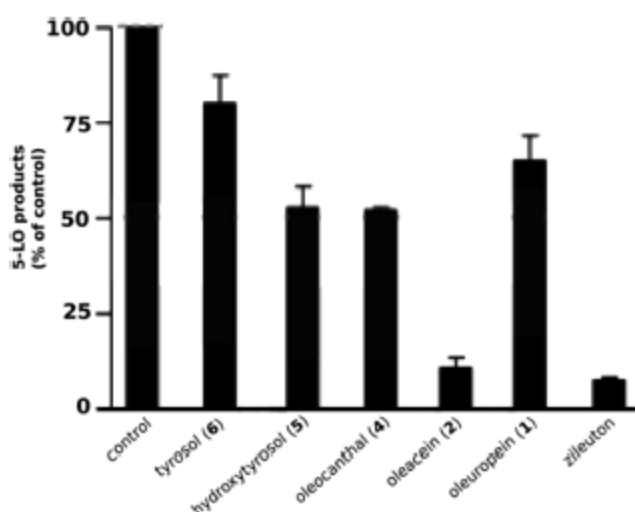


Figura 12: Attività della 5-LO (da Pavia-Martins F et al.,2002)

1.8.2 L'oleaceina nella prevenzione per le malattie cardiovascolari

In letteratura è stato riportato che l'Oleaceina inibisce l'attività della endopeptidasi neutrale (NEP) che è una glicoproteina metallo-proteasi zinco dipendente di membrana espressa nei tessuti polmonari, renali e neuronali e svolge la funzione di degradazione peptidica.

I neutrofili (leucociti polimorfo nucleati o PMN) sono la prima linea di difesa del sistema immunitario innato che in caso di infiammazione cronica crescono di numero e aumentano il numero di recettori di membrana per le molecole di adesione endoteliale che sono coinvolte nell'aterosclerosi.

I neutrofili sono anche fonte di NEP che degrada numerosi peptidi come il peptide natriuretico atriale (ANP) e il peptide natriuretico celebrale (BNP). Questi peptidi svolgono la funzione di diuresi, vasodilatazione e inibizione del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Pertanto l'Oleaceina, inibendo questo enzima, ha dimostrato avere un ruolo protettivo nelle lesioni endoteliali dei vasi, nelle malattie cardiovascolari, nell'infarto del miocardio acuto e nell'ipertensione.²³⁻²⁶

L'Oleaceina ha anche un'azione protettiva nei confronti delle cellule EPC (cellule progenitrici endoteliali). Queste cellule, di derivazione midollare sono dotate della capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature.

Le cellule endoteliali mature sono responsabili della neovascolizzazione del tessuto ischemico, partecipano alla riparazione delle arterie lesionate nell'aterosclerosi e sono coinvolte nei processi di angiogenesi ovvero nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni.²⁷⁻²⁹

L'oleaceina potrebbe anche avere un ruolo protettivo nell'ipertensione non solo perché inibisce la NEP ma anche perché è un ACE inibitore e quindi contrasta la sintesi dell'angiotensina II che è uno dei fattori responsabili di questa patologia.³⁰⁻³²

Inoltre l'angiotensina II induce allo stress ossidativo dell'endotelio vascolare e accelera l'invecchiamento di tale sistema, dunque contrastandola, si riduce l'ossidazione e la possibilità di sviluppare l'aterosclerosi.³³

L'oleaceina come altri composti fenolici presenti nell'olio d'oliva, inibisce l'ossidazione delle LDL, diminuisce lo stress ossidativo indotto dall'emolisi degli eritrociti e diminuisce il rilascio di specie reattive dell'ossigeno.³⁴

2. INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

L'olio di oliva è uno degli alimenti più antichi e più rappresentativi della tradizione gastronomica dei paesi mediterranei e per i suoi riconosciuti benefici effetti salutistici costituisce l'alimento caratterizzante della "dieta mediterranea".

L'olio di oliva è ottenuto dalla semplice spremitura del frutto della pianta *Olea europaea* L., senza l'utilizzo di processi o sostanze chimiche e in condizioni tali che non causino alterazioni dell'olio. Attraverso il suddetto sistema di produzione, l'olio mantiene immutato sia il contenuto lipidico, sia il contenuto dei "componenti minori" quali gli antiossidanti che sono risultati essere importanti da un punto di vista nutraceutico.

Per quanto riguarda tutti gli altri tipi di oli, durante il processo di raffinazione, il contenuto degli antiossidanti viene notevolmente ridotto o completamente perso.

I primi studi riguardanti le proprietà nutraceutiche dell'olio d'oliva risalgono agli anni cinquanta e misero in evidenza come l'utilizzo praticamente esclusivo dell'olio d'oliva per il condimento e la cottura dei cibi fosse in relazione ad un più basso indice di mortalità per malattie coronariche rispetto all'utilizzo di burro o oli di origine vegetale.⁶

L'olio d'oliva è formato essenzialmente da due componenti: uno di natura lipidica apolare che costituisce circa il 98-99% del totale e l'altro di natura polare che è rappresentato principalmente da tocoferoli, polifenoli, carotenoidi, clorofilla ed alcoli. La frazione lipidica dell'olio d'oliva, a differenza di altri grassi di origine vegetale, è ricca in acidi grassi monoinsaturi, tra i quali il più abbondante è l'acido oleico (**Figura 1**).

Esso rappresenta più del 70% dell'intera frazione lipidica ed ha dato prova di contrastare l'insorgenza dell'ischemia cardiovascolare.^{2,5}

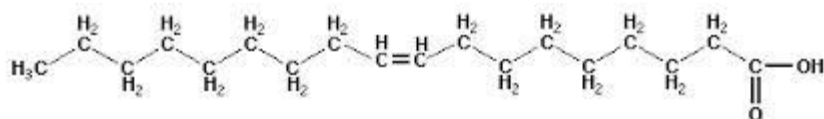


Figura 1: Acido oleico(C18)

Sono presenti inoltre, in quantità minori, l'acido linoleico e l'acido linolenico, che fanno parte rispettivamente degli acidi di categoria omega-6 e omega-3. Essi sono acidi grassi essenziali e perciò devono essere introdotti necessariamente con la dieta e sono coinvolti nella produzione di energia, formazione di membrane cellulari, sintesi dell'emoglobina e nel corretto equilibrio ormonale.

Attualmente esiste un'ampia letteratura scientifica che conferma le proprietà salutistiche dell'olio d'oliva.

È stato infatti dimostrato che l'olio d'oliva nella sua totalità contrasta l'invecchiamento cellulare, possiede una modesta azione preventiva sulla trombosi, inibisce la secrezione acida dello stomaco e favorisce la secrezione pancreatica e il drenaggio della bile.

Infine gli è stata attribuita una discreta attività anti-infiammatoria e un ruolo importante per la formazione e la crescita delle ossa lunghe.^{2,3}

Le proprietà salutistiche dell'olio d'oliva vengono attribuite principalmente alla componente fenolica e polifenolica della quale sono stati individuati almeno 36 composti che possiedono importanti proprietà antiossidanti, antimicrobiche ed anti-infiammatorie.

Recentemente anche l'EFSA (autorità europea per la sicurezza alimentare), secondo il Regolamento CE 1924/2006, ha approvato un "health claim" con il quale si riconoscono specifici effetti salutistici dell'olio d'oliva riferiti ai composti fenolici e polifenolici quali tirosolo, idrossitirosolo e oleuropeina: "i polifenoli dell'olio d'oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo; questa indicazione può essere impiegata solo per l'olio d'oliva che contiene almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati (ad esempio complesso oleuropeina e tirosolo) per 20 g di olio d'oliva" (dose giornaliera raccomandata).

E' noto infatti che i polifenoli si legano alle lipoproteine a bassa densità (LDL, low-density lipoproteins, conosciute anche come "colesterolo buono") sottraendole così all'ossidazione da parte dei radicali liberi che è la principale causa dello sviluppo di malattie cronico-degenerative come l'aterosclerosi.

Diversi studi hanno evidenziato come i polifenoli dell'olio d'oliva e in particolare l'oleuropeina e l'idrossitirosolo, siano in grado di "ripulire" l'organismo dai radicali perossidici, dal radicale superossido, dall'acido ipocloroso e dallo ione perossinitrato.³⁵

E' noto che quando la quantità di radicali liberi prodotta è superiore a quella neutralizzabile dal nostro sistema antiossidante, si innesta un processo di stress ossidativo che gioca un ruolo fondamentale nell'invecchiamento cellulare e che è correlato con l'insorgenza di malattie croniche cardiovascolari e diabete. Il danno cellulare inizia a livello della membrana lipidica, per poi condurre ad una alterata formazione di ATP fino ad arrivare a modificazioni del DNA che sono alla base della cancerogenesi.

Diversi studi hanno quindi dimostrato gli effetti positivi dell'azione antiossidante dei fenoli e polifenoli dell'olio d'oliva su certi parametri fisiologici, riducendo anche lo sviluppo di malattie croniche e degenerative come le malattie cardiovascolari, la malattia di Alzheimer e il diabete.³⁶

Inoltre possono svolgere un'importante azione di prevenzione tumorale, ostacolando il processo di cancerogenesi attraverso un'attività antiossidante e anti-infiammatoria (mediata dalle COX 1 e COX 2) ma anche per interferenza su specifici meccanismi cellulari.³⁷

La famiglia dei composti fenolici e polifenolici, caratteristici dell'olio d'oliva, comprende composti semplici come il tirosolo e l'idrossitirosolo e composti più complessi come i derivati secoiridoidi. In particolare per questa classe di composti, l'oleaceina e l'oleuropeina aglicone sono derivati dell'idrossitirosolo mentre l'oleocantale e ligstroside aglicone sono derivati del tirosolo (**Figura 2**).³⁸

Le loro concentrazioni nell'olio dipendono sia dalla cultivar, dal livello di maturazione del frutto, dall'irrigazione, dalla presenza di parassiti, dalle tecnologie di trasformazione delle olive in olio e dalle modalità di conservazione dello stesso.

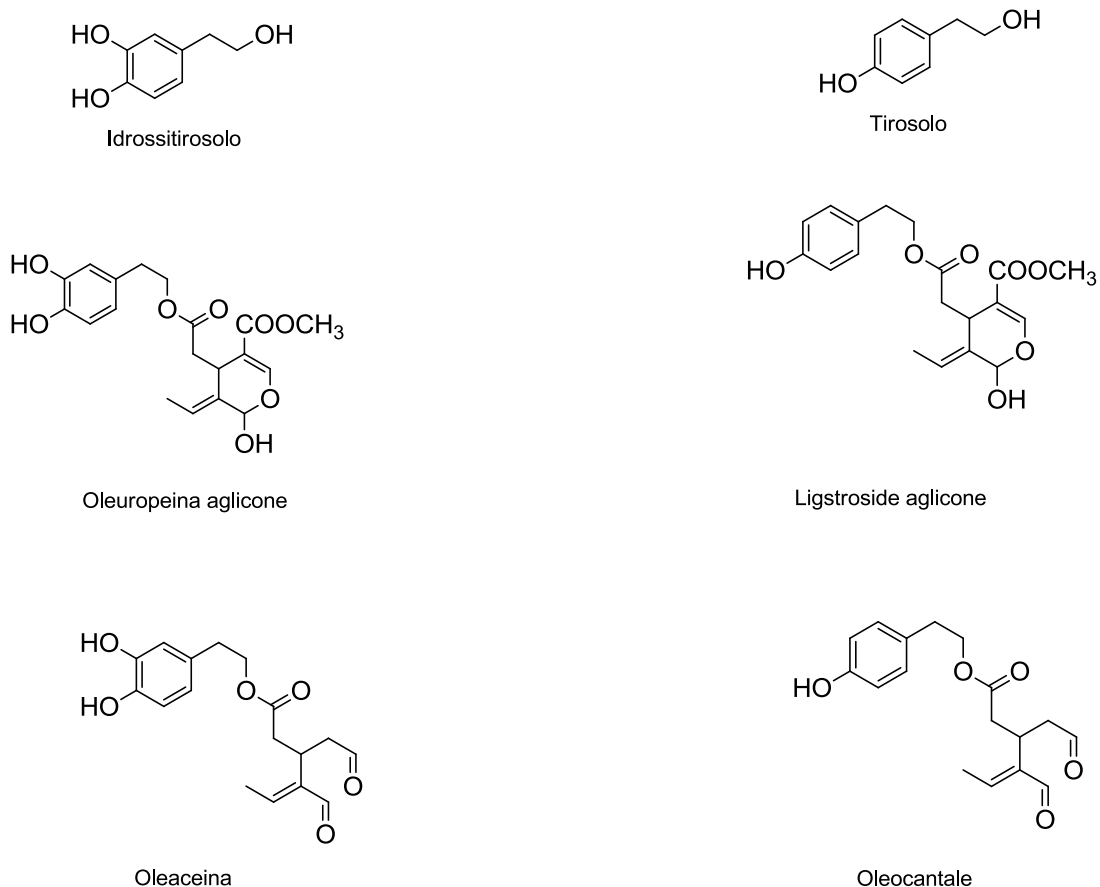


Figura 2: Principali composti fenolici e polifenolici dell'olio vergine d'oliva ad elevato valore nutraceutico.

L'oleocantale è responsabile della caratteristica sensazione pungente e irritante associata all'ingestione di olio, poiché è in grado di legarsi e stimolare i recettori TRPA1 espressi a livello della mucosa faringea; questa stessa azione è esercitata anche dall'ibuprofene, noto farmaco anti-infiammatorio inibitore non selettivo delle ciclossigenasi (COX). Bechaump¹⁶ ha in seguito dimostrato che l'oleocantale esercita un effetto inibitorio sulle ciclossigenasi con un meccanismo d'azione analogo a quello dell'ibuprofene.

Tale attività giustifica anche la sua potenziale attività salutistica per diverse malattie croniche come quelle cardiovascolari e per malattie infiammatorie degenerative alle articolazioni.³⁹

Infine l'oleocantale ha mostrato attività preventiva verso alcune forme di cancro gastrico poiché possiede azione antimicrobica contro i microorganismi responsabili dell'ulcera gastrica.

È stato anche descritto come potenzialmente utile per contrastare lo sviluppo di malattie neurodegenerative quale l'Alzheimer, per la sua capacità di prevenire la A- β oligomerizzazione e la tau aggregazione.⁴⁰

L'oleuropeina aglicone, è molto attiva nell'inibire l'aggregazione piastrinica e ha mostrato un effetto protettivo verso l'Alzheimer ed alcune forme di cancro.

L'oleaceina, altro derivato secoridoide dell'olio d'oliva, ha mostrato proprietà molto simili a quelle dell'oleocantale e, in particolare, possiede un'ottima attività antiossidante^{20,22}e antiproliferativa.⁴¹

Inoltre è stato anche dimostrato che l'oleaceina svolge un'azione inibitoria nei confronti dell'Enzima Convertitore dell'Angiotensina (ACE) e dell'Enzima Endopeptidasi Neutrale (NEP) risultando quindi potenzialmente utile per la prevenzione di malattie cardiovascolari.³²

L'Oleaceina ha anche una forte azione anti-infiammatoria. Tale attività sembra legata alla sua capacità di inibire l'enzima 5-lipossigenasi (5-LO), che è responsabile della biosintesi dei leucotrieni pro-infiammatori.²⁰⁻²²

Comunque i meccanismi d'azione, nonché i profili di biodisponibilità di questa famiglia di composti non sono stati completamente chiariti.

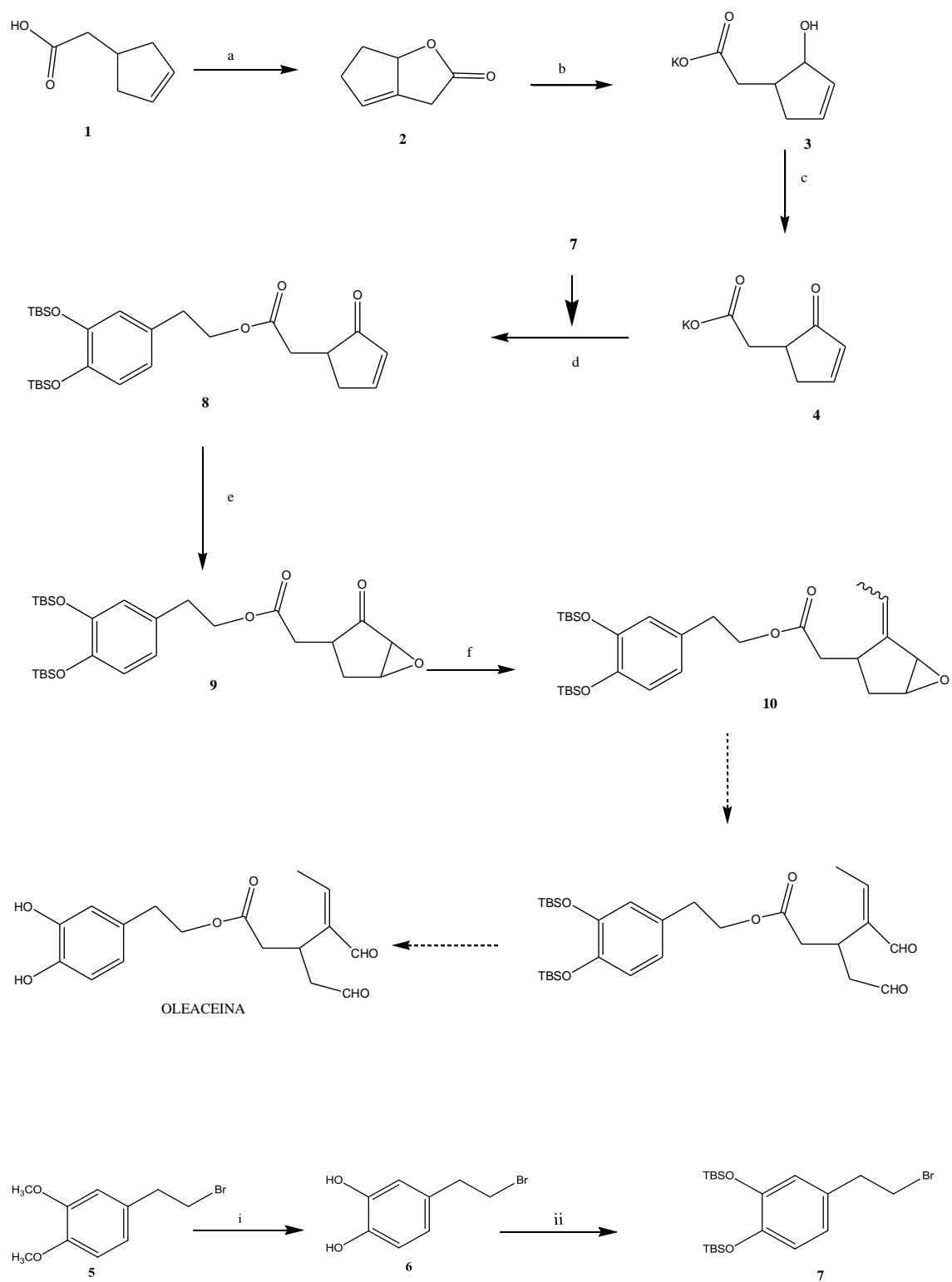
Il mio lavoro di tesi si inserisce in un ampio progetto multidisciplinare finalizzato a studiare le proprietà nutraceutiche dell'olio d'oliva tal quale e dei suoi componenti fenolici e polifenolici, quali tirosolo, idrossitirosolo, oleuropeina, oleocantale ed oleaceina, questi ultimi due non ancora oggetto di "health claim".

Inoltre risulta fondamentale la disponibilità di standard puri che possano essere utilizzati sia per gli studi analitici, che per studi biochimico-farmacologici e per studi di tecnologia farmaceutica.

In particolare, tra i fenoli e polifenoli oggetto delle ricerche, questa tesi è stata focalizzata sulla messa a punto di un metodo di sintesi per l'oleaceina, composto non disponibile in commercio. Tale metodo di sintesi è stato sviluppato modificando opportunamente una procedura già utilizzata nel laboratorio di ricerca dove ho svolto la tesi, per la sintesi dell'oleocantale.

Inoltre è stata applicata una metodica mediante risonanza magnetica nucleare per la determinazione quantitativa dell'oleaceina.

SCHEMA DI SINTESI



Reagenti e condizioni: (a) $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, HBF_4 , CH_3COOH , temperatura ambiente, 2h; (b) KOH 10M, EtOH , 60°C , overnight; (c) MnO_2 , EtOH assoluto, temperatura ambiente, overnight; (d) **5**, TMEDA, DMF anh., TBAI, temperatura ambiente, overnight; (e) *t*-BuOOH, DBU, CH_2Cl_2 anh., temperatura ambiente, overnight; (f) EtPPh_3Br , KHMDS, toluene anh., -78°C , 1h; (i) CH_2Cl_2 anidro, BBr_3 per 10 minuti a -60°C poi per 4 h a temperatura ambiente; (ii) TBDMSCl, imidazolo, CH_2Cl_2 , 15°C per 10 minuti, temperatura ambiente overnight.

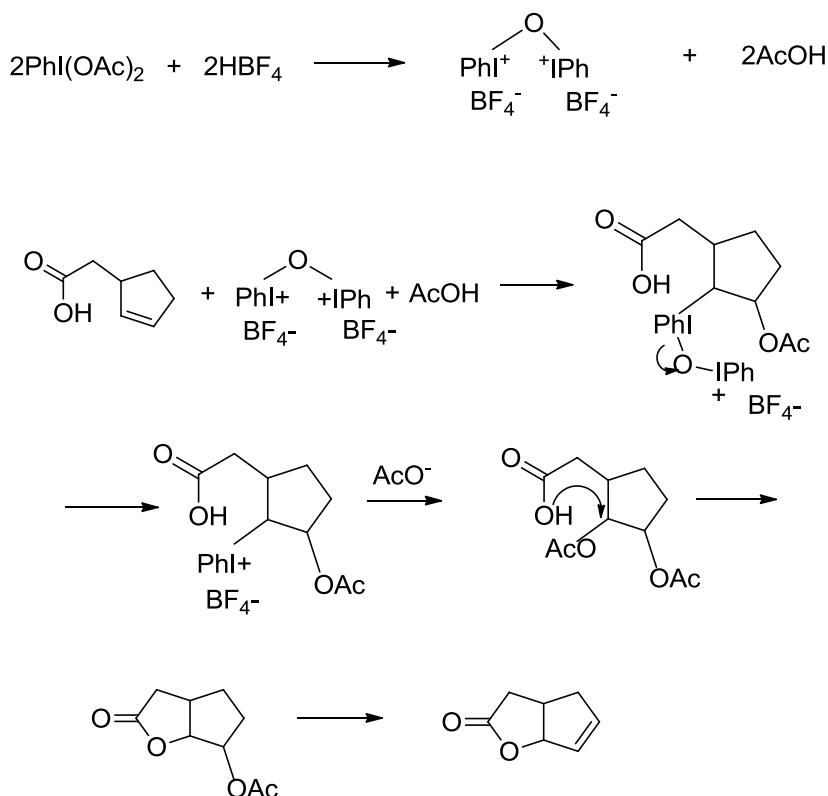
Il primo passaggio della via di sintesi illustrata nello schema, consiste nella formazione del lattone **2** a partire dall'acido 2-ciclopenten-1-acetico (**1**).

La reazione di lattonizzazione fra l'acido insaturo **1** e la specie reattiva, ottenuta facendo reagire il diacetossi iodio benzene con l'acido tetrafluoroborico, è stata effettuata seguendo due metodiche diverse.

La prima prevede l'ottenimento della specie reattiva, lo iodoso benzene tetrafluoro borato di colore giallo, per reazione fra $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ e HBF_4 in CHCl_3 .

Questo sale è stato quindi isolato e fatto reagire con l'acido monoinsaturo **1** in acido acetico per un'ora a temperatura ambiente per ottenere un grezzo di reazione che purificato mediante flash cromatografia, utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/AcOEt 8:2, ha fornito il lattone **2** in rese dell'60%.⁴²

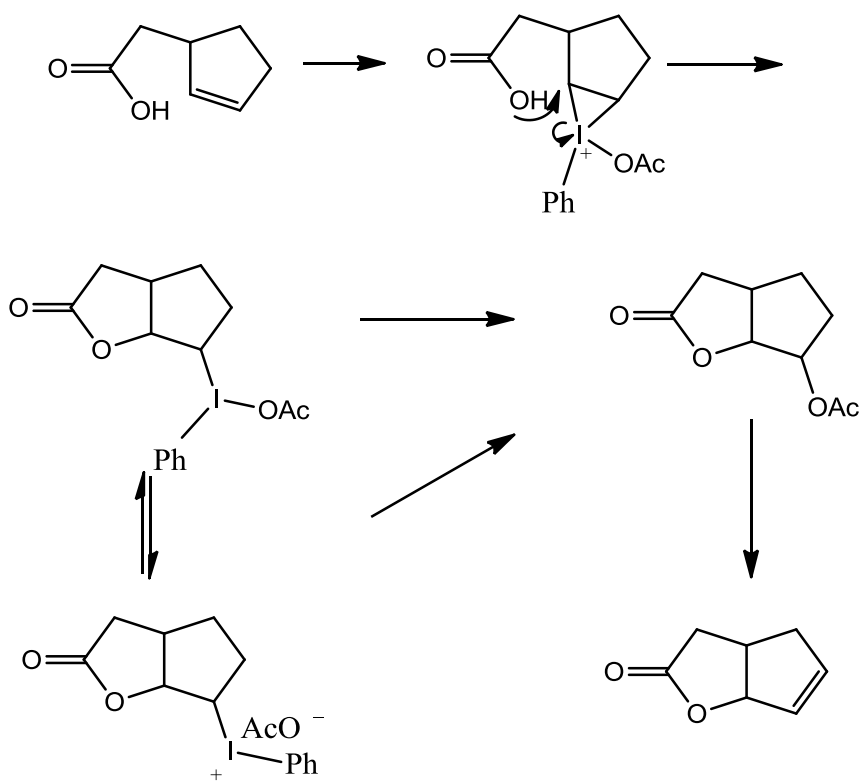
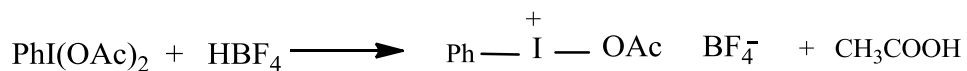
La reazione avviene secondo il meccanismo riportato di seguito:



Il secondo metodo prevede la formazione della specie reattiva, cioè il sale acetossi feniliodonio tetrafluoroborato, per reazione tra $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ e HBF_4 in acido acetico a temperatura ambiente per un'ora e la successiva aggiunta dell'acido **1**.

La miscela di reazione viene lasciata reagire sotto agitazione un'ora a temperatura ambiente per ottenere il lattone **2** purificato mediante flash cromatografia nelle condizioni riportate precedentemente (resa 48%).⁴³

La reazione segue il meccanismo illustrato di seguito:



Lo step successivo consiste nell'idrolisi del lattone con una soluzione acquosa di KOH 10 M in etanolo per ottenere il sale di potassio **3** (Schema di sintesi).

In letteratura⁴⁴ è stato riportato che per far sì che la reazione di idrolisi vada a completezza è necessario 1 equivalente di KOH, mentre è stato riscontrato che sono necessari 2 equivalenti di base.

Tuttavia utilizzando un solo equivalente di KOH il sale può essere purificato mediante triturazione con etere dietilico che permette il recupero del lattone non reagito.

La reazione successiva consiste nell'ossidazione dell'alcol allilico del composto **3** a dare il corrispondente chetone **4**. Abbiamo eseguito la procedura presente in letteratura^{42,44} che riporta la reazione con MnO₂ in etanolo assoluto per 23 ore a temperatura ambiente, però usando MnO₂ attivato in quanto è utilizzato come ossidante selettivo di alcol allilici come anche di quelli benzilici.

La scelta dell'etanolo si è resa necessaria per la limitata solubilità del sale **3**.

In letteratura comunque è riportato che i solventi polari hanno un forte effetto inibente nei confronti del MnO₂ attivato, nonostante ciò l'ossidazione del sale **3** è avvenuta con una resa del 40%.

Successivamente il composto **4** è stato fatto reagire con il bromo derivato **7** in DMF e N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TMEDA) (1.1% v/v) in presenza di una quantità catalitica di tetrabutilammonio ioduro (TBAI).

Il grezzo ottenuto dalla reazione è stato purificato mediante flash cromatografia utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 8:2, per ottenere l'estere desiderato **8** con una resa del 15%.

Il bromo derivato **7** è stato preparato a partire dal 4-(2-bromoetil)-1,2-dimetossibenzene (**5**) che per reazione di *O*-demetilazione ha condotto al derivato fenolico **6**. Tale reazione è stata svolta aggiungendo alla soluzione del dimetossi derivato **5** in diclorometano a -60°C e sotto flusso di N₂ una soluzione di tribromuro di boro in diclorometano.

La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a -60°C per 10 minuti e a temperatura ambiente per 4 ore. Successivamente è stato aggiunto a freddo e cautamente il metanolo per bloccare la reazione.

Il solvente è stato poi evaporato per ottenere un solido che è stato più volte triturato con etere di petrolio per fornire il composto fenolico **6**.

Il bromo derivato **7** è stato preparato per reazione tra il derivato fenolico **6** e il *t*-butil dimetilsilil cloruro in CH₂Cl₂ e aggiungendo un eccesso di imidazolo a 15°C durante un periodo di dieci minuti.

Successivamente la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore.⁴⁵

Il grezzo di reazione ha però evidenziato la non completa protezione dei due gruppi fenolici e quindi è stato sottoposto alla stessa reazione che ha fornito, il prodotto desiderato **7** con un resa del 88%.

L'eossido **9** è stato ottenuto per reazione dell'estere **8** con *t*-BuOOH, in presenza di diazabiclico(5.4.0)undec-5-ene (DBU) come catalizzatore in CH₂Cl₂ anidro, che ha fornito un grezzo di reazione purificato tramite flash cromatografia utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 9:1. L'eossido **9** è stato ottenuto con una resa del 15%.

L'eossido **9** è stato poi sottoposto ad una reazione di Wittig per trattamento con etil trifenilfosfonio bromuro e KHMDS in toluene a -70°C. In particolare è stata prima formata l'ilide per deprotonazione dell'etil trifenil fosfonio bromuro con KHMDS in toluene a -70°C.

L'avvenuta reazione è resa evidente per l'intensa colorazione rossa della soluzione alla quale è stato poi aggiunto il chetone disciolto nella minima quantità di toluene.

Attualmente è in corso la purificazione del grezzo di reazione per ottenere l'eossido **10**.

Il derivato **10** verrà successivamente sottoposto ad idrolisi ossidativa e ad una reazione di deprotezione degli ossidrili fenolici che consentiranno di ottenere l'oleaceina come miscela di isomeri E/Z.

Durante il lavoro di tesi, con l'obiettivo di sviluppare metodiche analitiche per la determinazione dell'oleaceina nell'olio di oliva, è stata studiata e applicata una metodica recentemente riportata in letteratura³⁸ che prevede l'impiego della risonanza magnetica nucleare (^1H NMR).

Infatti l'oleaceina presenta un segnale caratteristico a $\delta=9.18$ ppm dovuto al gruppo aldeidico in posizione 5.

Questo segnale è presente anche in altri derivati secoiridoidi ma cade a campi diversi (Figura 3).

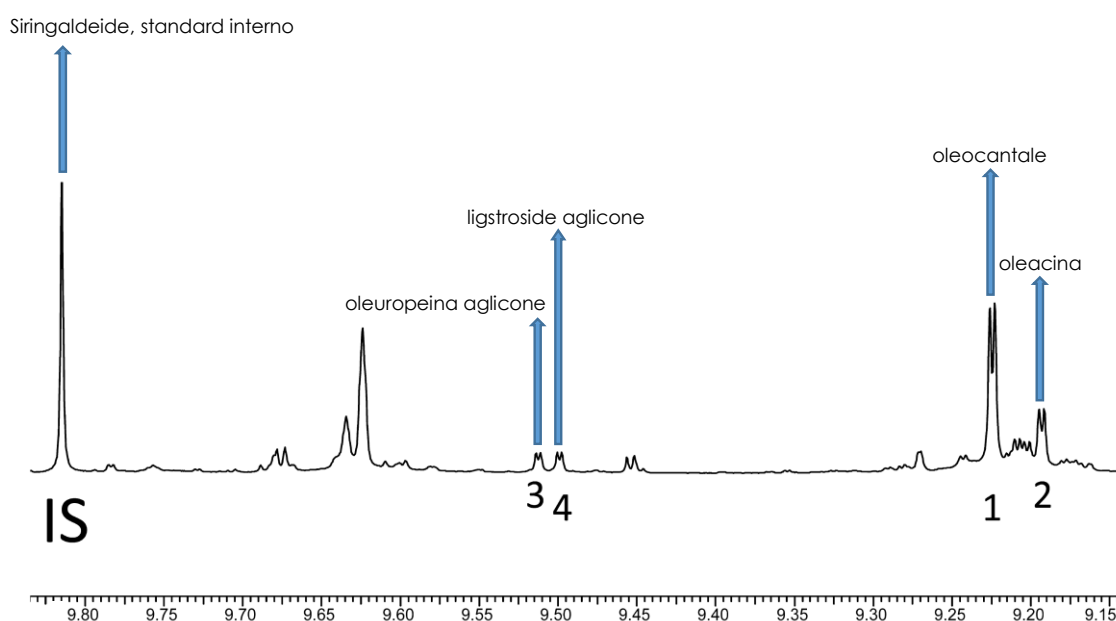


Figura 3: Spettro ^1H NMR dei derivati secoiridoidi dell'olio vergine d'oliva

Per poter ottenere il campione da analizzare all' ^1H -NMR, l'olio d'oliva è stato sottoposto a un trattamento con cicloesano e acetonitrile in rapporto 4:5 (v/v) in modo da ottenere la fase acetonitrilica in cui si solubilizzano i composti d'interesse. A tale fase è stata aggiunta una soluzione di siringaldeide in acetonitrile (0.50 mg/mL) come standard interno ed in seguito la soluzione risultante è stata evaporata.

Il residuo ottenuto è stato ripreso con CDCl_3 e trasferito in un tubicino per NMR.

Come esempio è riportato in **Figura 4** uno degli spettri ottenuti, registrato con uno spettrometro Bruker Avance operante a 400 MHz ed in cui i segnali sono stati integrati manualmente (TopSpin 3.2).

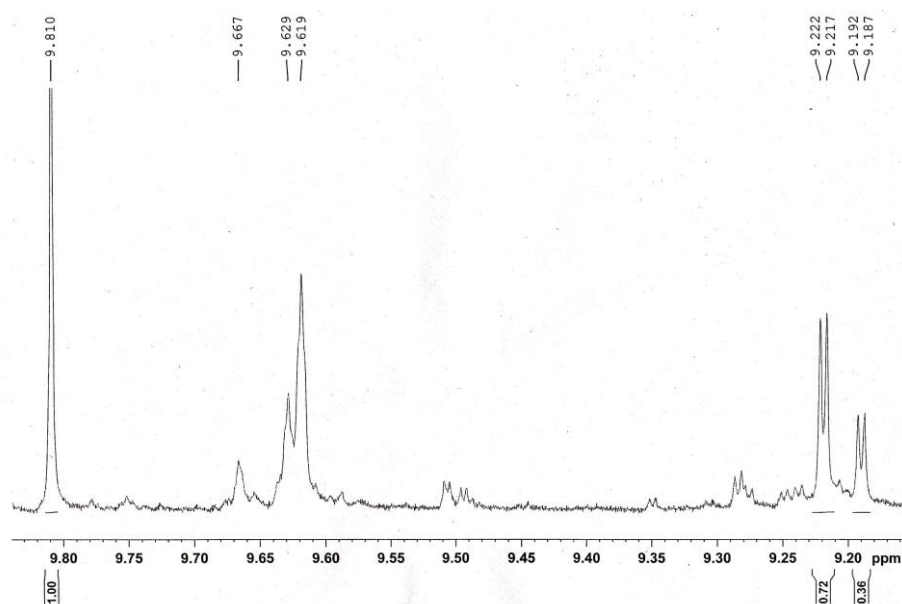


Figura 4: Spettro ^1H NMR del campione 4 dell'olio di oliva

Tale metodica, al fine di determinare il contenuto dell'oleaceina, è stata applicata a campioni di olio di oliva.

Una prima valutazione dei livelli di Oleaceina è stata effettuata rapportando l'integrazione del suo caratteristico segnale aldeidico ($\delta=9.18$ ppm) a quella del segnale aldeidico della siringaldeide ($\delta=9.81$ ppm), alla quale è stato attribuito un valore pari ad 1.

Seguendo questa metodica nella **tabella 1** sono riportate le integrazioni del segnale caratteristico dell'oleaceina.

I risultati evidenziano che ci sono quantità variabili nei diversi tipi di olio.

Campione Olio	Integrazione Oleocantale	Integrazione Oleaceina
1	0,80	0.46
2	0,00	0.00
3	0,47	0.45
4	0,72	0.36
5	0,50	0.21

Tabella 1: Valutazione del contenuto relativo di oleaceina per diversi tipi di olio vergine d'oliva

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 SINTESI

MATERIALE E METODI

La struttura di tutti i composti è stata verificata per mezzo della spettrometria ^1H -NMR.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare protonica sono stati eseguiti con uno spettrometro Bruker Avance operante a 400 MHz e riferiti al segnale residuo del solvente.

I chemical shift δ sono espressi in ppm e le costanti di accoppiamento J sono espresse in Hz.

Le evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante.

Le TLC analitiche sono state eseguite usando lastre di gel di silice 60 F254 (MERCK) contenenti un indicatore fluorescente; le varie macchie sono state evidenziate per mezzo di lampada UV (254 nm).

Per la cromatografia su colonna è stato usato gel di silice 60 (0.040-0.063 mm) (MERCK).

Sintesi composto 2

Primo metodo

A 5ml di CHCl_3 sono stati aggiunti $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (3.22 g, 10 mmol) e HBF_4 al 48% (2 mL, 31.89 mmol), la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente, per mezz'ora per consentire la formazione dello iodoso benzene tetrafluoroborato.

Successivamente la soluzione ottenuta è stata evaporata sottovuoto a 50°C e il residuo ottenuto (un olio giallo e denso) è stato trattato con CHCl_3 (10 mL) e H_2O (2mL).

I cristalli gialli ottenuti sono stati filtrati, lavati con CHCl_3 e H_2O ed essiccati sottovuoto in un essiccatore a P_2O_5 per 12 ore (3.8 g; Resa: 64%).

In seguito, ad una soluzione (colore giallo intenso) di iodoso benzene tetrafluoroborato (2 g, 3.35 mmol) in CH_3COOH (20 mL) è stato aggiunto l'acido **1** (0.8 mL, 6.69 mmol), la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente fino alla completa decolorazione della soluzione .

Secondo metodo

A 8 mL di CH_3COOH sono stati aggiunti $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (3.32 g, 10 mmol) e HBF_4 al 48% (1.8 mL, 28.69 mmol).

La soluzione gialla che ne risulta è stata lasciata sotto agitazione per un'ora a temperatura ambiente.

In seguito è stato aggiunto l'acido **1** (0.6 mL, 5.0 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica, sempre a temperatura ambiente, finché la totale scomparsa del prodotto di partenza non è stata verificata mediante TLC (etere di petrolio /AcOEt 8:2, v/v).

Successivamente per entrambi i metodi la reazione è stata trattata mediante l'aggiunta di H_2O (10 mL) e la soluzione acquosa ottenuta è stata estratta con CHCl_3 (x3).

La fase organica è stata quindi essiccata su NaSO_4 anidro, filtrata ed evaporata sottovuoto.

Il grezzo così ottenuto è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice usando come eluente una miscela etere di petrolio/AcOEt 8:2 (v/v).

Le opportune frazioni riunite hanno fornito 1,05 g di composto **2** (primo metodo) e 1.345 g di composto **2** (secondo metodo).

Resa (primo metodo): 80 %

Resa (secondo metodo): 55%

¹HNMR δ (ppm) (CDCl₃): 6.09-6.07 (m, 1H), 5.89-5.87 (m, 1H), 5.52 (d, J = 7.6 Hz), 3.18-3.09 (m, 1H), 2.87-2.77 (m, 1H), 2.76-2.71 (m, 1H), 2.35-2.28 (m, 2H).

Sintesi composto 3

Ad una soluzione del composto **2** (1.4 g, 11.27 mmol) in EtOH (45.08 ml) è stata aggiunta una soluzione acquosa di KOH 10 M (1.127 ml, 11.27 mmol) e la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a 70°C overnight. Dopo aver evaporato il solvente, il residuo ottenuto è stato triturato con Et₂O recuperando così il composto **2** non reagito.

Il solido biancastro (1.3 g) così ottenuto è stato utilizzato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

RESA: 64 %

¹HNMR: (MeOD) δ (ppm) : 5.97-5.95 (m, 1H), 5.82-5.78 (m, 1H), 4.66-4.64 (m, 1H), 2.55-2.41 (m, 3 H), 2.40-2.27 (m, 1H), 2.19-2.12 (m, 1H).

Sintesi composto 4

Ad una soluzione del composto **3** (1.3 g, 7.21 mmol) in EtOH assoluto (14,35 ml) è stato aggiunto MnO₂ attivato (12.54 g, 144.3 mmol).

La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente, overnight.

Successivamente la miscela di reazione è stata filtrata su celite e la soluzione ottenuta è stata evaporata sottovuoto per fornire il composto **4** (0.515 g) utilizzato nello step successivo senza ulteriori purificazioni.

RESA: 40 %

¹HNMR: (MeOD) δ (ppm): 7.82-7.80 (m, 1H), 6.15-6.13 (m, 1H) 3.26-3.18 (m, 5H)

Sintesi composto 6

Ad una soluzione di 4-(2-bromoetil)-1,2-dimetossibenzene (composto 5) (0.700 g, 2.86 mmol) in CH_2Cl_2 anidro (31.8 ml) è stato aggiunto alla temperatura di -70°C il tribromuro di boro (8.26 ml), si lascia a questa temperatura per 10 minuti, dopo di che la reazione viene condotta a temperatura ambiente per 4 h.

La miscela di reazione viene stoppata con cauta aggiunta a freddo di MeOH (40 ml). Infine il solvente viene evaporato e il grezzo ottenuto viene triturato con l'etere di petrolio più volte fino ad ottenere un solido grigiastro/nero (composto 6, 1 g) che è stato utilizzato nello step successivo senza ulteriori purificazioni.

RESA: quantitativa

$^1\text{H NMR}$ $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3): 8.5 (brs, 2H), 6.79 (d, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.65 (2d, 1H). 3.6-3.5 (t, 2H), 3.10-3.00 (t, 2H).

Sintesi composto 7

Ad una soluzione di 4-(2-bromoetil)benzene-1,2-diolo (composto **6**, 0.657 g, 3.303 mmol) in CH_2Cl_2 (13.71 ml) è stato aggiunto a temperatura ambiente il tert-butildimetilsilil cloruro (0.913 g, 6.06 mmol).

La soluzione è stata portata alla temperatura di 15°C ed è stato aggiunto l'imidazolo (0.413 g, 6.06 mmol) in piccole porzioni.

La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente e monitorata tramite TLC. Dopo circa 16h la miscela di reazione è stata diluita con CH_2Cl_2 e lavata con H_2O (x3).

La fase organica è stata essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata. Dall'analisi $^1\text{HNMR}$ dell'olio ottenuto è risultata la presenza del prodotto **7** non completamente protetto, quindi tale olio è stato sottoposto alla stessa reazione e nelle stesse condizioni: CH_2Cl_2 (25 ml), tert-butildimetilsilil cloruro (1.7 g, 11.24 mmol), l'imidazolo (765 mg, 11.24 mmol).

Il grezzo di reazione che si ottiene (composto **7**, 2.67 g) è stato utilizzato nello step successivo senza ulteriori purificazioni in quanto è risultato con una purezza accettabile dall'analisi $^1\text{HNMR}$.

RESA: 88%

$^1\text{HNMR}$ δ (ppm) (CDCl_3) : 6.75 (d, 1H), 6.67 (d, 1H), 6.62 (2d, 1H), 3.00 (t, 2H), 3.35 (t, 2H), 1.2 (s, 18H), 0.3 (s, 12H).

Sintesi composto 8

La reazione è stata condotta in un pallone a due colli fiammeggiando sotto N₂. Ad una soluzione del composto **4** (0.300 g, 1.68 mmol) in DMF anidro (3.63 ml) è stata aggiunta TMEDA (0.041 ml).

La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per un'ora.

Successivamente è stata aggiunta la soluzione del composto **7** (1,5 g, 3.36 mmol) in DMF anidro (3.66 ml).

Infine è stata aggiunta una quantità catalitica di TBAI lasciando la miscela di reazione a temperatura ambiente overnight.

In seguito è stato aggiunto Et₂O (50 ml) e il contenuto del pallone è stato trasferito in un imbuto separatore ed estratto con H₂O (25 ml).

La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata.

Il grezzo ottenuto è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice usando come eluente una miscela etere di petrolio/acetato di etile 8:2 (v/v).

Le opportune frazioni, riunite ed evaporate, hanno fornito 123 mg di composto **8**.

La purificazione ha comunque permesso di recuperare 573 mg del composto **7**.

RESA: 15 %

¹HNMR δ(ppm) (CDCl₃): 7.77-7.76 (m, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.66 (d, 1H), 6.62 (2d, 1H), 6.30-6.20 (m, 1H), 1.0 (s, 18H), 0.3 (s, 12H).

Sintesi composto 9

Preparazione della soluzione di t-BuOOH in CH₂Cl₂: in un pallone fiammeggiato sotto N₂ sono stati aggiunti CH₂Cl₂ anidro (18 mL), il t-BuOOH (1.86 mL) e H₂O (10.26 mL). La miscela di reazione è stata lasciata per qualche minuto sotto agitazione dopo di che il contenuto del pallone è stato trasferito in un imbuto separatore. E' stata isolata la fase organica, essicata su Na₂SO₄ anidro per 20 minuti e filtrata.

In un pallone a due colli fiammeggiato sotto N₂ è stata aggiunta la soluzione di t-BuOOH in CH₂Cl₂ (3.50 mL, 0.23 mmol) e poi una soluzione del composto **8** (123 mg, 0.24 mmol) in CH₂Cl₂ anidro (0.350 mL) e DBU (7.16 µL, 0.048 mmol), la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 h e quindi trattata con una soluzione satura di NH₄Cl (1.37 mL) e una soluzione satura di Na₂S₂O₃ (1.37 mL). Il contenuto del pallone è stato trasferito in un imbuto separatore ed estratto con CH₂Cl₂ (2.7 mL x 3). La fase organica è stata essicata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata.

Il grezzo così ottenuto è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice usando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile 9:1 (v/v).

Le opportune frazioni riunite ed evaporate hanno fornito 0.0188 g di composto puro **9**.

RESA: 15%

¹HNMR δ(ppm) (CDCl₃): 6.80-6.60 (m, 3H), 2.9-2.4 (m, 5H), 1.0 (s, 18H), 0.2 (s, 12H).

Sintesi composto 10

In un pallone a tre colli fiammeggiato sotto N₂, sono stati aggiunti toluene anidro (2.57 mL) e EtPPh₃Br (411 mg, 1.11 mmol) e la soluzione risultante è stata portata a -70°C.

Alla miscela di reazione è stato aggiunto KHMDS (0.24 mL, 1.11 mmol) e successivamente il pallone è stato portato alla temperatura di 22 °C.

Alla comparsa di una colorazione arancio-rossa nella miscela di reazione è stata subito aggiunta una soluzione del composto **9** (70 mg, 0.13 mmol) in toluene anidro (1.02 mL).

Dopo un'ora a -70°C la reazione è stata portata a temperatura ambiente e trattata con una soluzione satura di NH₄Cl (3 mL), trasferita in un imbuto separatore e lavata con Et₂O (3 x 5 mL).

La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata portando ad un grezzo di 45 mg.

3.2 ANALISI ^1H NMR

Materiali e Metodi.

La siringaldeide usata come standard interno (IS) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich.

La soluzione dello standard interno è stata preparata in acetonitrile alla concentrazione di 0.5 mg/mL e stoccata in frigorifero. Il CDCl_3 usato per tutti gli esperimenti è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich.

Gli oli analizzati sono stati reperiti da diversi produttori toscani.

Estrazione dell'olio d'oliva e preparazione dei campioni per l'analisi NMR.

Sia l'estrazione che la preparazione dei campioni sono state fatte seguendo la procedura riportata.³⁸

A 5 g di olio di oliva sono stati aggiunti 20 mL di cicloesano e 25 mL di acetonitrile. La miscela è stata omogeneizzata usando il vortex per 30 s e centrifugata a 4100 rpm per 5 minuti.

In seguito è stata raccolta la fase acetonitrilica, miscelata con 1 mL della soluzione di siringaldeide (0.5 mg/mL) precedentemente preparata ed evaporata al rotavapor.

Analisi ^1H NMR.

Il residuo della procedura descritta sopra è stato dissolto in CDCl_3 (750 μL) e un volume accuratamente misurato (550 μL) di questa soluzione è stato trasferito in un tubicino da NMR (5 mm).

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati mediante l'utilizzo di uno spettrometro NMR (Bruker Avance 400) a 400 MHz.

Sono state effettuate 50 scansioni per ciascun campione con un numero di punti di 64K all'interno di un intervallo spettrale di 16 ppm con un tempo di rilassamento di 1 s e un tempo di acquisizione di 5.4 s.

Prima della trasformata di Fourier (FT) è stato applicato un fattore esponenziale di moltiplicazione (line broadening, lb) di 0.3 Hz.

L'integrazione dei picchi è stata effettuata manualmente, così da ottenere un'integrazione accurata dei picchi d'interesse.

Valutazione relativa del contenuto di oleaceina .

Una prima valutazione del contenuto dell'oleaceina è stata realizzata basandosi sul rapporto d'integrazione tra il segnale del protone aldeidico relativo all' oleaceina a 9.18 ppm e quello del protone aldeidico della siringaldeide, settato a 9.81 ppm.

4.BIBLIOGRAFIA

1. Cicerale S. *et al.*, *In Tech.*, **2012**, ISBN 978-953-307-921-9
2. Garcia-Gonzalez *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2008**, 110, 602-607
3. Scarmeas N. *et al.*, *Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. Journal of American Medical Association.*, **2009**, 302, 627-637
4. Iacono A. *et al.*, *Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by LPS in chondrocyte cell line. Arthritis & Rheumatism.*, **2010**, 62, 1675-1682
5. Corona G. *et al.*, *extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in GI tract. toxicology and industrial health.*, **2009**, 25, 285-293
6. Keys A., *Circulation.*, **1970**, 41, 1-211
7. López-Miranda J. *et al.*, *Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain).*, **2008**, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20, 284-294
8. Harper C. R. *et al.*, *Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects. Journal of Nutrition.*, **2006**, 136, 2844-2848
9. Aguilera C. M. *et al.*, *Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. Clinical Nutrition.*, **2004**, 23, 673-681
10. Cancilla *et al.*, *From Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **2014**, Ahead of Print.
11. Obied *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, 1167–1179.
12. Gomez-Rico A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 7130-7136.
13. Ayton J *et al.*, *Quality and oxidative stability of Australian olive oil according to harvest date and irrigation. Journal of Food Lipids.*, **2007**, 14, 138-156
14. Angerosa F. *et al.*, *Journal of Chromatography A.*, **2004**, 1054, 17–31
15. Vinha A. *et al.*, *Food Chem.*, **2005**, 89, 561-568
16. Bechaump G., K. *et al.*, *Nature.*, **2005**, 437, 45-46
17. Morello J. R. *et al.*, *Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and*

- Morrut cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**2004**. 52, 6002-6009
18. Kalua C. M. *et al*, *Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**2006b**, 54, 7641-7651
 19. Servili M. *et al*, *Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**2007b**, 55, 7028-7035
 20. . *et al*, *Food Chem.*, **2011**, 131, 940–947
 21. Parzonko A. *et al*, *Phytomedicine*,**2013**, 20, 1088–1094
 22. Paiva-Martins F. *et al*, *Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 135–140.
 23. Baetta R. *et al*, *Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives. Atherosclerosis*, **2010**,210(1), 1–13
 24. Czerwinska M. *et al*, *A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. Food Chemistry*, **2012**, 131(3), 940–947
 25. Freitas M. *et al*, *Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. Analytica Chimica Acta*, **2009**,649(1), 8–23
 26. Matsumura T. *et al*, *Neutral endopeptidase 24.11 in neutrophils modulates protective effects of natriuretic peptides against neutrophils-induced endothelial cytotoxicity. Journal of Clinical Investigation*, **1996** ,97(10), 2192–2203
 27. Gulati R. *et al*, *Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury. Circulation*,**2003**. 108, 1520–1526
 28. Takahashi T. *et al*, *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bonemarrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nature Medicine*,**1999**, 434–438
 29. Kawamoto A. *et al*, *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation*, **2001**,103, 634–637

30. Kiss A. K. *et al.*, *Ethnopharmacol.*, **2008**, *120*, 220–225
31. Hansen K. *et al.*, *Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE)inhibitor from Olea europaea and Olea lancea. Phytomedicine.*,**1996**,*2*, 319–325
32. .Kiss A.K. *et al.*, *Dual inhibition of metallopeptidases ACE andNEP by extracts, and iridoids from Ligustrum vulgare L. Journal of Ethnopharma-cology.*,**2008**,*120*, 220–225
33. Visioli F. *et al.*, *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis.*,**1995**,*117*(1), 25–32
34. Visioli F. *et al.*, *Free radical-scavenging properties of oliveoil polyphenols. Biochemical and Biophysical Research Communications.*,**1998**,*247*,60–64.
35. Boskou D. *et al.*, *Current Topics in Nutraceutical Research.*,**2005**, *3*, 125-136
36. Cicerale S. *et al.*, *Rev. Food Sci. Nutr.*, **2008**, *49*, 218-236
37. Amara S., G. *et al.*, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *159*, 79.
38. Karkoula E. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* , **2012**, *60*, 11696-11703
39. Iacono A. *et al.*, *Arthritis & Rheumatism.*, **2010**, *62*, 1675-1682.
40. Li W. *et al.*, *Journal of Neurochemistry.*, **2009**, *110*, 1339-1351
41. Corona G. *et al.*,*Biochem.Biophys.Res.Commun.*,**2007**,*362*,606-611
42. Tojo G. *et al.*, *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones.*, **2006**, Springer, New York
43. Tiecco M. *et al.*, *Tetrahedron.*, **1990**, *46*, 7139-7150
44. Impellizzeri J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 3204-3208
45. Matthias T. et al., *4-(2-Bromoethyl)phenoxy]-(1,1dimethylethyl)dimethylsilane; Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of Technology, Getreidemarkt.*, **2009**,*9/1630C*, A-1060